

「アミロイド線維におけるクロスβ構造の自己触媒的複製機構の解明」 神戸大学大学院理学研究科 茶谷 絵理

1 研究の背景と目的

1-1. 背景

アミロイド線維は、タンパク質のミスフォールディングによって形成される超分子重合体である(図1)。これまでにプリオン病やアルツハイマー病などに関わる30種類以上のアミロイド線維が報告されている。さらに昨今では、パーキンソン病やハンチントン病などの神経変性疾患に見られる沈着物もアミロイド線維に類似した構造を示すことが明らかとなり、アミロイド線維の構造形成機構の解明には強い関心が寄せられている。

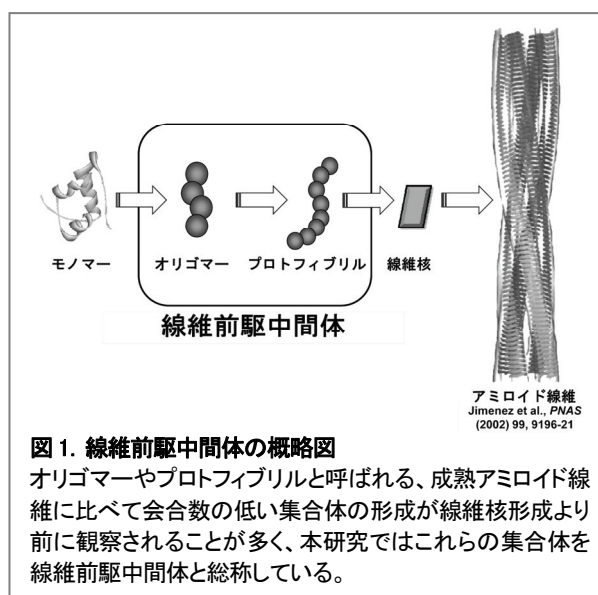
アミロイド線維は、「核依存性伸長」、すなわち、自らの末端構造を鋳型としてモノマー体のタンパク質が同じ立体構造を形成して重合してゆく反応様式に基づき、自己の構造を複製し、構造を伝播してゆく性質を持つことが知られている。本反応は、疾病の感染および伝播の分子基盤として注目されているものの、鋳型構造をどのように認識しクロスβ構造を複製するのか、その詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、アミロイド線維の末端で構造が複製し、構造伝播する分子機構をアミノ酸残基レベルで解明し、制御することを目的とした解析を行った。

著者らはこれまでに、アミロイド線維が伸長する際に経由する「伸長中間体」を捉え特性を明らかにする研究を進めてきた。伸長中間体は、理論的には予測される一方で、実験的な確認例は報告されていなかった。ところが、反応条件を従来のものから大幅に変更し、反応時のモノマーとシードの量比を調整することで、過渡的な中間体の蓄積を確認することができた(参考文献1)。続いて、より詳細な伸長中間体の構造特徴を明らかにするため、水素/重水素標識-NMR法を用いての構造解析を試みた。その結果、中間体構造はほぼほどけた状態で線維と弱く結合していることが明らかとなった(参考文献2)。

1-2. 目的

以上の研究経緯を踏まえ、本研究では、伸長と解離に重要な役割を果たす領域をより具体的に確認するために、「アミロイド線維前駆中間体」という新たなアミロイド形成関連中間体に着目し、本中間体の捕捉の試みならびに構造特徴の解析を実施した。

アミロイド線維の形成初期過程においては、オリゴマーやさらに集合レベルの進んだプロトフィブリルなど、いくつかの異なるサイズおよび構造レベルの凝集体を経由することが報告されている(図2)。これらの未熟な集合体は、

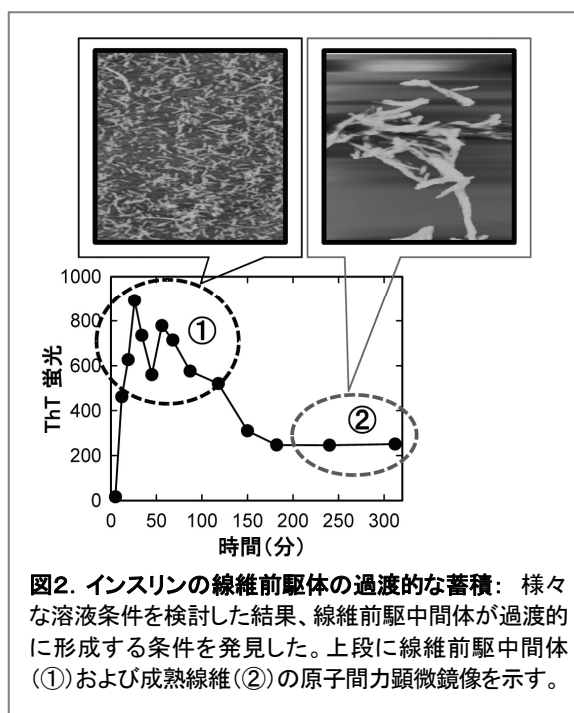


「線維前駆中間体」と総称される。最終的に形成されるアミロイド線維は β シート構造に富んだ立体構造 (クロス β 構造) を特徴的に示すが、線維化初期段階に形成されるオリゴマーやプロトフィブリルのような前駆中間体では、クロス β 構造が完全には構築されておらず、伝播性も未発現である。そこで、この中間体を捕捉して成熟アミロイド線維と構造比較することによって、クロス β 構造において伝播性が発現するために必要な領域を明らかにできるのではないかと考え、インスリンをモデルタンパク質に用いて捕捉を試みた。

2 研究方法・研究内容

2-1. 線維前駆中間体の捕捉実験

インスリンは、酸性条件下で加熱するだけで容易に核形成し、自発的な線維形成が進行する。これを基本条件としたうえで様々な溶媒条件を検討した結果、高塩濃度を添加した条件では、反応開始直後に著しいチオフラビンT蛍光の上昇が確認され、その後低い値へと収束する2段階の変化が確認された。原子間力顕微鏡観察を行った結果、高いチオフラビンT蛍光を示す時間領域では、微細なアミロイド線維が形成しており、その後、これらが会合して太く成熟したアミロイド線維になることが分かった (図2)。さらに、得られた中間体および成熟線維を超音波破碎により断片化し、新たなインスリン水溶液に添加してシーディング反応を行ったところ、後半の成熟型の線維が形成するまでアミロイド線維の伝播性も発揮されておらず、反応開始直後に形成される微細なアミロイド線維は、オリゴマーやプロトフィブリルに相当するアミロイド線維前駆中間体に相当することが考えられた。



2-2. 線維前駆中間体の構造特徴の解析

線維前駆中間体構造を明らかにするために、FTIR スペクトルによる解析を行った。その結果、線維前駆中間体構造ではクロス β 構造が未成熟であり、一部のクロス β 構造のみが形成されている様子が明らかとなった。成熟化が進むにつれて、さらなるクロス β 構造が発達する様子が確認された。このことより、段階的にクロス β 構造が発達する様子が実証され、クロス β 構造の自己触媒的複製には特異的なクロス β 構造領域が関与する可能性が考えられた。

そこで、得られた前駆中間体についてプロテアーゼ消化を行い、生成したペプチドフラグメントをマス解析により同定することで、切断されたアミノ酸配列領域を決定した。その結果、前駆体のみで酵素消化されやすい領域が存在することが確認された。当該領域は、線維前駆中間体からアミロイド線維へと構造成熟化する時にクロス β 構造を形成する領域

であることを考慮すると、アミロイド線維の伝播に貢献する部位に相当すると考えられる。以上の解析より、アミロイド線維の伝播性にはタンパク質のある特異的なアミノ酸配列領域が関与している可能性が実験的に提案された。

2-3. 中間体から成熟アミロイド線維へのサイズ発展の解析

さらに、アミロイド線維の伝播性発現の機構をより詳細に解明するために、さきの前駆中間体が形成途中に蓄積する条件において、タンパク質分子が構成要素としてどのように会合して線維核構造を形成するのかを小角 X 線散乱法 (SAXS) による時分割測定で明らかにするための研究に着手した。本測定については、京都大学化学研究所の金谷利治博士、井上倫太郎博士らの協力を得て、SPring-8 でデータ収集を実施した。

本測定では、先述の実験より高濃度のインスリンが必要であったが、上記と類似した線維前駆中間体の蓄積が確認される塩濃度を慎重に選択した。その後、温度コントローラーを用いて、セルに封入したインスリン水溶液を短時間で高温にジャンプさせ、その後一定に保温す

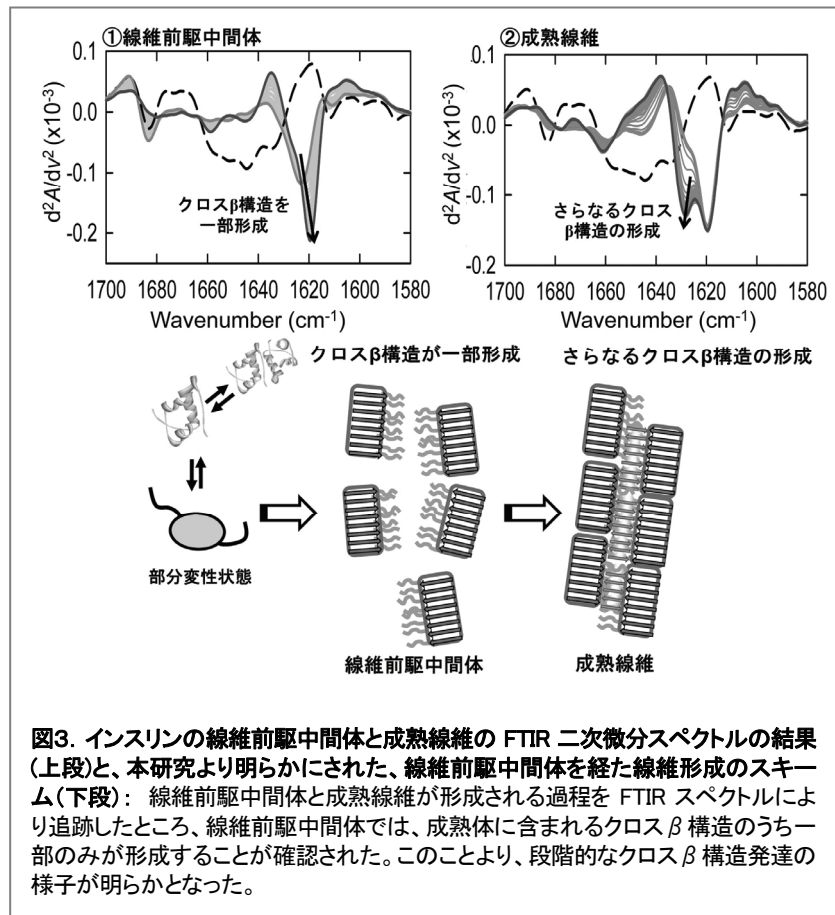


図3. インスリンの線維前駆中間体と成熟線維の FTIR 二次微分スペクトルの結果 (上段)と、本研究より明らかにされた、線維前駆中間体を経た線維形成のスキーム(下段)：線維前駆中間体と成熟線維が形成される過程を FTIR スペクトルにより追跡したところ、線維前駆中間体では、成熟体に含まれるクロスβ構造のうち一部のみが形成することが確認された。このことより、段階的なクロスβ構造発達の様子が明らかとなった。

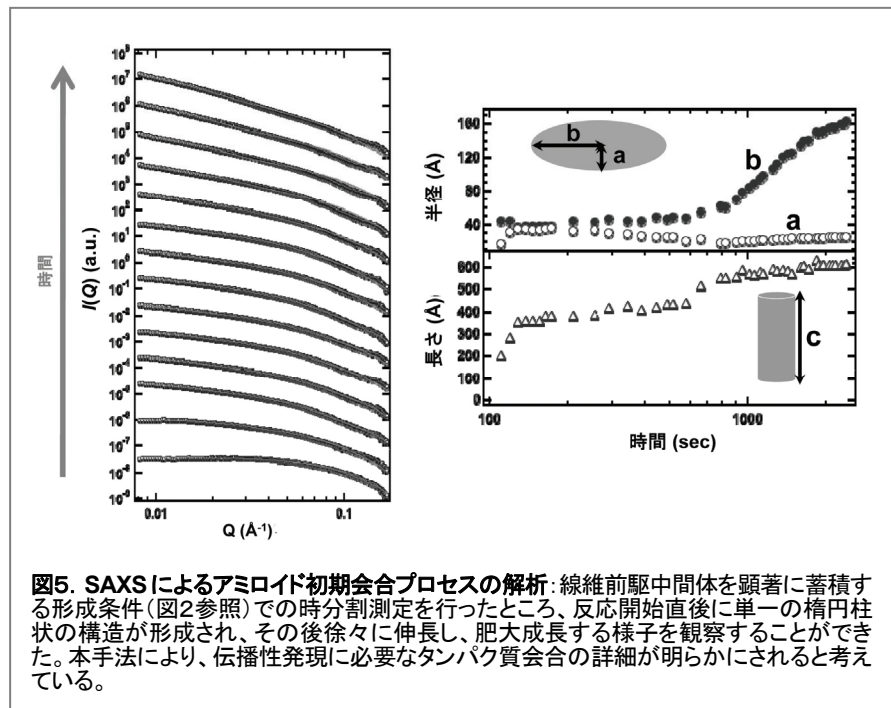


図5. SAXSによるアミロイド初期会合プロセスの解析：線維前駆中間体を顕著に蓄積する形成条件(図2参照)での時分割測定を行ったところ、反応開始直後に単一の楕円柱状の構造が形成され、その後徐々に伸長し、肥大成長する様子を観察することができた。本手法により、伝播性発現に必要なタンパク質会合の詳細が明らかにされると考えている。

ることによって線維形成反応を誘導し、これに同期させて広角・小角 X 線散乱同時測定を開始した。その後、約 10 秒間隔の時分割測定を反応終了まで繰り返した。

現在一連のデータを解析している最中であるが、本測定によって、特に小角領域において明らかな散乱強度の経時変化が観察されており、反応に伴う構造変化の情報を得ることができた。本測定により、アミロイド線維形成に伴い、線維前駆中間体が集合していきながら成熟型のアミロイド線維が形成される様子が明らかになると期待している。

3 研究成果

以上の結果から、アミロイド線維末端でモノマー分子が結合し構造変化する際に関わるのは、全アミノ酸配列のうちのごく限られた領域に限定されていることが考えられた。これは、構造複製の基本原理をアミノ酸残基レベルで理解を進めるために重要な知見であると考えている。

また、複雑な階層構造を有するアミロイドの線維化過程を追跡するのは非常に困難であるが、SAXS は幅広い空間スケールを有しており、本解析に適した手法であると期待される。これまでの結果より、非常に均一な構造を持つ中間体構造が反応初期に形成され、さらに構造発達する様子が確認された。さらに詳細な解析を進め、伝播性の発現に重要なタンパク質分子の会合メカニズムを解明し、論文に投稿したいと考えている。

4 生活や産業への貢献および波及効果

アミロイド線維の構造複製の分子機構は、多くの研究者により注目されているものの、解析の困難性により解明は進んでいなかった。本研究を通して、伝播領域の特定および核形成の分子機構の理解が進めば、線維の形成阻害や分解促進による抗アミロイドーシス治療薬の開発につながる詳細な知見が得られる。さらには、プリオン病でのウシ-ヒト感染のような、種を超えた感染の機構に対しても理解が進み、タンパク質レベルでアミロイドーシス感染予防に取り組むことが可能になると考えている。本結果は、アミロイド線維の伝播機構解明に向けては、まだ端緒的な成果であるものの、今後も本課題の解明研究に真摯に取り組んでいきたいと考えている。

5 参考文献

1. Eri Chatani[†], Reina Ohnishi[†], Tsuyoshi Konuma, Kazumasa Sakurai, Hironobu Naiki, and Yuji Goto ([†]equally contributed)
"Pre-steady-state kinetic analysis of amyloid fibrils of β_2 -microglobulin with tryptophan mutagenesis"
J. Mol. Biol. **400**, 1057-1066 (2010)
2. Tsuyoshi Konuma[†], Eri Chatani[†], Masanori Yagi, Kazumasa Sakurai, Takahisa Ikegami, Hironobu Naiki, and Yuji Goto ([†]equally contributed)
"Kinetic intermediates of β_2 -microglobulin fibril elongation probed by pulse-labeling H/D exchange combined with NMR analysis" *J. Mol. Biol.* **405**, 851-862 (2011)